

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

10/518317

EPO-BERLIN

02-10-2003



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 27 OCT 2003

WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 28 081.9

Anmeldetag: 18. Juni 2002

Anmelder/Inhaber: Invitek Gesellschaft für Biotechnik & Biodesign mbH,
Berlin/DE

Bezeichnung: Verfahren zum Nachweis einer gesteigerten Tumorsuszeptibilität

IPC: C 12 Q 1/68

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. Juni 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Jerofsky

Best Available Copy

ANWALTSKANZLEI
Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider
Patente · Marken · Design · Lizenzen

Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider, Schützenstraße 15-17, 10117 Berlin

Patentanwälte
European Patent and Trademark Attorneys

Klaus W. Gulde, Dipl.-Chem.
Jürgen D. Hengelhaupt, Dipl.-Ing.*
Dr. Marlene K. Ziebig, Dipl.-Chem.**
Henry Schneider, Dipl.-Ing.
Wilfried H. Goesch, Dipl.-Ing.*
Dieter K. Wicht, Dipl.-Ing.*
Isolde U. Winkler, Dipl.-Ing.

Rechtsanwalt Jörg K. Grzam

Schützenstraße 15-17

D-10117 Berlin

Tel.: 030/206230 / 030/264 13 30

Fax: 030/264 18 38

office@berlin-patent.net
www.berlin-patent.net

Unser Zeich./our reference
P145402DE-Zie/ra
Datum/date
Berlin, 18.06.2002

Invitek
Gesellschaft für Biotechnik & Biodesign mbH
Robert-Rössle-Str. 10

13125 Berlin

Verfahren zum Nachweis einer gesteigerten Tumorsuszeptibilität

Verfahren zum Nachweis einer gesteigerten Tumorsuszeptibilität

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer gesteigerten Tumorsuszeptibilität durch eine spezifische Detektion eines Polymorphismus an der Position 354 A → G im Exon 12 des humanen murine-double-minute-gene-2 (MDM2-Gen). Dieser Polymorphismus stellt einen hereditären Marker für ein erhöhtes Krebsrisiko beim Menschen dar. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung dieses Tumorsuszeptibilitätsmarkers zur Entwicklung von in vitro- und in-vivo Testsystemen, die in spezifischer Weise diesen Marker für diagnostische, prognostische und möglicherweise auch therapeutische Verfahren einbinden.

Das mdm2-Gen wurde erstmals in der spontan transformierten Mauszelllinie 3T3DM auf "double minute" Chromosomen identifiziert. Es ist bekannt, dass das Genprodukt MDM2 Mausfibroblasten transformieren und zu einem unkontrollierten und tumorauslösenden Wachstum führen kann. Das humane mdm2-Gen ist auf dem Chromosomenabschnitt 12q13-14 lokalisiert und gewann an Bedeutung als sich zeigte, dass es einen wichtigen Gegenspieler für das p53-Tumorsuppressorgen darstellt. Die gegenseitige Regulation erfolgt über einen "feed-back loop", d.h. das p53-Protein aktiviert die Transkription des mdm2-Gens und das gebildete MDM2-Protein kann wiederum den Abbau des P53-Proteins bewirken. Das MDM2-Protein besitzt eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität für P53, wodurch letzteres für den proteosomalen Abbau markiert wird. Hierdurch wird eine sehr feine Regulation der Expression des P53-Proteins bewirkt, welche vor allem in der Embryogenese essentiell ist. So sind mdm-2 "knock-out"-Mäuse letal, aber überleben, wenn sie zusätzlich auch kein funktionell aktives p53-Gen tragen. Es

ist weiterhin bekannt, dass neben der Wechselwirkung mit dem p53-Tumorsuppressor MDM2 auch einen weiteren Tumorsuppressor-Stoffwechselweg beeinflusst, d.h. den von Rb-E2F-p16INK4A/p19ARF. So kann MDM2 an das RB-Protein binden und den Rb-vermittelten G1-Zellzyklusarrest verhindern bzw. direkt mit den Transkriptionsfaktoren E2F1/DP wechselwirken und einen Übergang der Zellen in die S-Phase bewirken. Die negative Regulation von beiden Tumorsuppressorwegen, die in ca. 80 % aller Tumoren betroffen sind, sowie zahlreiche Befunde, die belegen, dass das MDM2-Protein tumorgen wirkt, favorisieren das mdm2-Gen als ein Ziel für eine Gentherapie.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass spezifische Bereiche von MDM2 mit zahlreichen Proteinen, wie P53, CBP/p300, pRB, p73, E2F1, DP1, dem L5 ribosomalen Ribonukleoprotein-Partikel, p14ARF und RNA wechselwirken können. Die spezifischen Funktionen von MDM2 in der Tumorgenese, dem Zellzyklus und der Apoptose werden in exzellenten Übersichtsarbeiten diskutiert (Freedman et al., 1999, Momand et al., 2000, Juven-Gershon and Oren, 1999).

Die Rolle des mdm2 wurde insbesondere an Sarkomen untersucht, d.h. an bösartigen Tumoren mesenchymalen Ursprungs. Sarkome weisen mit 20-30% die höchste Amplifikationsrate für das mdm2-Gen unter den malignen Tumoren auf. Eine Überexpression von MDM2 in transgenen Mäusen resultiert in 38% der Fälle in einer Sarkomentwicklung (unabhängig vom p53-Status). Eine MDM2-Überexpression in Sarkom-Patienten korreliert signifikant mit einem schlechteren Überleben der betroffenen Patienten, was in einer multivariaten Coxregressions-Analyse gezeigt werden konnte (Würl et al. 1997).

Insgesamt weiß man noch relativ wenig darüber, welche normalen bzw. tumorspezifischen Stoffwechselwege durch die mdm2-mRNA bzw. das MDM2-Protein beeinflusst werden. Ein Weg, um die Funktion von Genen zu untersuchen, besteht in der Analyse der

Auswirkung von Genalterationen. Das mdm2-Gen wurde bisher jedoch nur sehr wenig auf Genalterationen, d.h. Mutationen oder Polymorphismen untersucht. Es gibt nach intensiver Litearturrecherche insgesamt nur vier Publikationen zu diesem Themenkomplex. Dies sind ein Negativbefund (keine Genalterationsfunde) in humanen Primärtumoren (Silva et al. 2000), selten auftretende Punkt- und Insertionsmutationen im Zinkfingerbereich des MDM2 (Schlott et al. 1997), ein Polymorphismus im 5' untranslatierten Bereich (Heighway et al. 1994) und ein weiterer Polymorphismus im Exon 10 im Zinkfingerbereich (Taubert et al. 2000). Dieser Polymorphismus wurde ausschließlich für Weichteilsarkome (im Vergleich zur polymorphen Allelehäufigkeit bei gesunden Kontrollprobanden) ermittelt. Der Polymorphismus war mit einem Trend zu einem kürzeren Überleben (38 Monate gegenüber 57 Monate bei Patienten ohne Polymorphismus) verbunden.

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, tumor-assoziierte Mutationen bzw. Polymorphismen des menschlichen mdm2-Gens zu ermitteln und ihre Korrelationen mit Krankheitsprädispositionen festzustellen. Ausgehend von diesen Korrelationen soll ein Verfahren zur molekulargenetischen Diagnostik dieser Krankheitsprädispositionen entwickelt werden. Ziel ist die Etablierung eines Modells, in dessen Folge eine prophylaktische oder palliative Therapie durchführbar wird, die sowohl chirurgischen als auch medimenkatösen Charakter tragen kann.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, dass der in Codon 354 des Exons 12 des MDM2 Gens (Nucleotid 1373 der Sequenz NM_002392) auftretende Polymorphismus A → G (GAA → GAG) nicht auf Weichteilsarkome beschränkt ist, sondern mit der Prädisposition von verschiedenen malignen Tumorarten korreliert und überraschend hereditärer Natur ist, d.h. bereits in der Keimbahn konserviert vorliegt.

Es wurde gefunden, dass dieser Polymorphismus bevorzugt in bestimmten soliden Tumoren epithelialen Ursprungs (Prostatakarzinom-Entität) korreliert, aber nicht auf diese beschränkt ist, sondern auch für die Suszeptibilität weiterer solider und hämatologischer Tumore eine wesentliche Bedeutung besitzt.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert. Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Verfahren zum Nachweis einer Tumorsuszeptibilität, das dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Nukleinsäure eines Probanden isoliert und die Sequenz des menschlichen mdm2-Gens anhand des Basenaustausches A → G (GAA → GAG) an der Position 354 des Exons 12 genotypisiert wird, wobei eine hochspezifische und sehr sensitive Bestimmung des Alleliestatus dieses polymorphen Genortes (Unterscheidung von Homo- und Heterozygotie) bevorzugt im Hochdurchsatzverfahren erfolgt.

Die Genotypisierung erfolgt durch Sequenzierung oder durch andere Methoden, die für die Detektion von Punktmutationen geeignet sind. Dazu gehören PCR-gestützte Genotypisierungsverfahren, wie z.B. allel spezifische PCR, andere Genotypisierungsverfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden [Beispiele sind „dot blotting“ oder Oligonucleotide Ligation Assays“ (OLA)], Verfahren unter Verwendung von Restriktionsenzymen und „Single Nucleotide Polymorphism“ (SNP) Analyse mittels „Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry“ (MALDI) sowie prinzipiell jede zur Verfügung stehende Methode zur Variantendetektion einschließlich der Chiptechnologie in all ihren technologischen Ausführungen.

Ausgehend davon ist das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung eines breiten Spektrums verschiedenster Prädispositionen geeignet. In einer Ausführungsvariante der

Erfindung dient das Verfahren für den Nachweis des homozygoten oder heterozygoten Polymorphismus A → G an Position 354 (Exon 12) als hinreichendes Kriterium für die genetische Prädisposition für eine potentielle Tumorsuszeptibilität, insbesondere als hinreichendes Kriterium für die genetische Prädisposition für ein potentielles Tumorrisko des betroffenen Probanden und für seine Nachkommen.

In einer bevorzugten Variante ist das Verfahren anhand des Nachweises des homozygoten oder heterozygoten Polymorphismus als hinreichendes Kriterium einer potentiellen Tumorsuszeptibilität für solide epitheliale Tumoren, wie z.B. Prostatakarzinom (PCa), Mammakarzinom, Zervixkarzinom und/oder Ovarialkarzinom anzuwenden. Besonders bevorzugt ist das Verfahren für den Nachweis einer Tumorsuszeptibilität von PCa geeignet.

Es wird dem molekularbiologisch-spezialisierten Diagnostiker ein universeller hereditärer Tumormarker in die Hand gegeben.

Entsprechend der Erfindung besteht in Abhängigkeit des homozygoten oder heterozygoten Nachweises bestimmter Haplotypen die Möglichkeit, eine differenzierte Aussage zur genetischen Prädisposition zu treffen. Dadurch wird eine molekulargenetisch fundierte genetische Beratung ermöglicht.

Weiterhin stellt das Auffinden dieses Polymorphismus ggf. die diagnostische Grundlage für präventive Maßnahmen dar.

Der Nachweis erfolgt anhand isolierter Nukleinsäuren, wobei sowohl DNA als auch RNA verwendet werden kann. Isolierte RNA wird mit dem Fachmann bekannten Methoden in mRNA und cDNA umgeschrieben. Anschließend wird die DNA sequenziert.

Aufbauend auf dieser Erkenntnis können unter Verwendung dieser variablen (mutierten) Nukelotid-DNA-Sequenz erfindungsgemäß neue Klassen von Therapeutika entwickelt werden, die auf Gene

gerichtet sind, die die Pathways des mdm2-Gens beeinflussen, und das mdm2-Gen (oder damit zusammenhängender Gene) angreifen und via Regulation der Transkription und Translation sowie zur Beeinflussung von deren Effizienz, vorzugsweise durch Regulation der Expression, wirken.

Die Pathways des mdm2-Gens beeinflussende Gene sind z.T. bekannt. Dazu gehören zum Beispiel:

- p53 - p14
- Rb-p16INK4A/p19ARF-E2F
- mdr-1.

Bevorzugt führt dies zur Entwicklung von Therapeutika, die auf das humane mdm2-Gen gerichtet sind und dieses an der Position 354 A → G Exon 12 im MDM2-Gen angreifen.

Desweiteren sind Gegenstand der Erforschung in vitro- und in vivo-Testsysteme. Diese Testsysteme exprimieren die an der Position 354 A → G Exon 12 mutierte Sequenz des menschlichen mdm2-Gens, und können zur Untersuchung von Erkrankungen mit Beteiligung des mdm2-Gens dienen, sowie zur Entwicklung und Testung individuell spezifischer Therapeutika im allgemeinen.

Solche Testsysteme sind dem Fachmann bekannt und können Zelllinien, Xenotransplantat- und andere Tiermodelle usw. sein.

Im folgenden wird die Erforschung am Beispiel des Nachweises einer Tumorsuszeptibilität von Prostatakarzinomen (PCa) näher erläutert, ohne dass sie darauf beschränkt werden soll.

Bei der Durchführung der Analysen ausgewählter und präoperativ gewonnener Blut-DNA-Proben von Patienten mit urologischen Tumor-Proben wurde bei Patienten mit diagnostiziertem primären PCa mit entsprechender Familienanamnese (keine Hinweise auf familiäre PCa-Fälle) und entsprechender Therapie (überwiegend lokal begrenzte PCa, die mittels radiärer Prostatektomie unter

kurativem Behandlungsziel entfernt worden sind; seltener Fälle von mittels Chemotherapie behandelten hormonrefraktären PCa) ein gegenüber der Normalbevölkerung der Bundesrepublik Deutschland erhöhter Heterozygotiegrad für den mdm2-SNP A → G an der Position 354 (Exon 12) detektiert.

In sukzessiv erweiterten Analysen konnten bisher in 31 von 229 untersuchten DNA-Proben (13,5%) der Polymorphismus eindeutig nachgewiesen werden. Aus diesem Untersuchungsgut kann eindeutig geschlussfolgert werden, dass die mdm2-Polymorphismusrate gegenüber der Normalbevölkerung mehr als verdoppelt ist (unter der Annahme, dass sich unter den Kontrollprobanden, die zur Bestimmung des Heterozygotiegrades in der gesunden und jungen Normalbevölkerung herangezogen worden waren, auch männliche Probanden mit einem nicht prädiktiv definierbaren PCa-Risiko befinden). Dieses Ergebnis bedeutet, dass der heterozygote Genlocus ein potentieller Tumorsuszeptilitätsfaktor für Patienten mit sporadischem PCa darstellt.

Interessant war weiterhin die Beobachtung, dass in zwei DNA-Proben von Patienten mit fortgeschrittenen PCa homozygote Allelieresultate (beide Allele entsprachen dem Polymorphismus A → G an der Position 354 (Exon 12) auftraten.

Es konnten bestehende Probleme in der HTS-Anwendung für ein molekulares Screening zum Nachweis des individualspezifischen Allelstatus am zu untersuchenden mdm2-Genlocus gelöst werden. Die Bestimmung des zu untersuchenden mdm-2 Polymorphismus wurde mit hoher Sensitivität und bei exakter Typisierung von vorliegender Homo bzw.-Heterozygotie in Patienten-DNA parallel durchgeführt. Die gewählte Methodik ist einfach und schnell in der Durchführung und zeichnet sich durch einen hohen Grad an Reproduzierbarkeit und Robustheit aus.

Das Verfahren kann darüber hinaus hochintegrativ an eine vollautomatische DNA Extraktion aus kernhaltigen Blutzellen

gekoppelt werden und ist potentiell ebenfalls separat oder in Kombination mit der molekularen Probenvorbereitung vollständig automatisierbar. Das bevorzugte Nachweisverfahren basiert auf einem DNA-ELISA und nachfolgender indirekt enzymatischen Detektion des Hybridisierungsergebnisses im 96-well Format. Diese bevorzugte Ausführungsvariante eines DNA-ELISAs soll weitere Verfahrensmöglichkeiten zum molekularen Screenings des zu untersuchenden mdm2-Locus allerdings nicht einschränken. In der bevorzugten Ausführungsvariante (DNA-ELISA) wurden aus der zuvor isolierten genomischen DNA aus den zu untersuchenden Patienten-Blutproben mittels PCR-Technologie doppelsträngige DNA-Fragmente generiert, welche den zu untersuchenden mdm2-Genlocus flankieren. Das für die PCR Verwendung findende Primerpaar enthielt dabei einen Primer welcher an seiner 5'-Position biotinyliert war. Das generierte PCR-Fragment ist damit nach Amplifikation ebenfalls biotinyliert. Das PCR-Fragment wird nachfolgend an die Oberfläche einer Streptavidin beschichteten 96-Well Mikrotestplatte überführt und über die Biotinylierung an der Plattenoberfläche kovalent gebunden. Das an der Plattenoberfläche gebundene doppelsträngige DNA-Fragment wird nach Zugabe einer NaOH-Lösung denaturiert und der nichtgebundene DNA-Einzelstrang mittels eines kurzen Waschschrifftes entfernt. Der kovalent gebundenen DNA-Einzelstrang dient nachfolgend als Zielsequenz für eine basenkomplementäre Hybridisierungsreaktion zur Genotypisierung des mdm2 Status. Hybridisiert wird nachfolgend jeweils mit zwei FITC-markierten Oligonukleotidsonden/Probenamplifikat, welche basenkomplementär zu den beiden potenziell möglichen mdm2-Allelvarianten am zu untersuchenden mdm2-Locus sind. Der Nachweis der Hybridisierungsreaktion erfolgt indirekt enzymatisch über eine enzymkonjugierte Anti-FITC-Antikörperreaktion mit anschließendem Substratumsatz. Der Nachweis des vorliegenden Allelstatus erfolgt über die Auswertung der nach Ablauf der Reaktion entstandenen Farbumschläge bzw. deren Intensitäten in den jeweiligen Wells. Anhand der Farbmuster kann eindeutig über das Vorliegen von homozygoten bzw. heterozygoten Merkmalsträgern entschieden werden. Das Verfahren gestattet es, mit einer 96-Well-Platte

48 Patienten-DNAs simultan zu untersuchen. Die Reproduzierbarkeit und die Robustheit des Verfahrens wurden im Rahmen der untersuchten großen Probenumfänge einschließlich durchgeföhrter Blindserien bewiesen. Mittels zusätzlicher DNA Sequenzierung wurden die im DNA-ELISA generierten Ergebnisse bei einer Reihe der Proben eindeutig verifiziert.

Das Testergebnis wurde für alle auffälligen Proben und einer repräsentativen Probenzahl unauffälliger Proben reevaluiert und 100%ig durch ein anderes anerkanntes Nachweissystem (direkte PCR-DNA-Sequenzierung, ALF Express, PharmaciaBiotech) unabhängig bestätigt.

Darüber hinaus wurden in weiteren Blindexperimenten multiple DNA-Aliquots gleicher Probanden sowie Negativkontrollen in abhängigen und unabhängigen Versuchsserien bestimmt. Auch diese Untersuchungen ergaben vollständig übereinstimmende qualitative Ergebnisse, was die Sensitivität des gewählten Nachweisverfahrens belegt. Momentan laufen weiterführende Studien, mit denen endgültige statistische Auswertungen für mehr als 400 Patienten mit nachweisbarem sporadischen PCa erfolgen.

Laufende Untersuchungen zu anderen Karzinomtypen belegten die Assoziation des Auftretens dieses Genpolymorphismus mit einer gehäuften Tumorraten für weitere solide epitheliale Tumorentitäten. So wurde z.B. in 5 von bisher 32 untersuchten Blut-DNA-Proben (15,6%) von Patienten mit Mamma-, Zervix- oder Ovarialkarzinomen, ein heterozygoter mdm2-Alleliestatus nachgewiesen.

Zum Nachweis der Spezifität der beschriebenen PCR-ELISA-Analyseresultate wurde eine Probanden-Subpopulation mit bekanntem Alleliestatus zum polymorphen mdm2-Genort reevaluiert. Zusätzlich wurde versucht, durch eine Vergrößerung der Kontrollgruppe die genaue Heterozygotie-

frequenz in der Normalbevölkerung (alle in dieser Arbeit beschriebenen DNA-Proben stammen von gesunden Kontrollprobanden bzw. Tumorpatienten aus dem Einzugsgebiet Sachsen und Sachsen-Anhalts aus den Jahren 1996-2001 und wurden mit schriftlicher Einwilligung der Patienten gewonnen und nach der DNA-Präparation anonymisiert archiviert) definieren zu können. Die dafür eingesetzten DNA-Proben stammen ausschliesslich von Blutspendern mit entsprechend harten Einschlusskriterien für die entsprechenden Blutspenden (kein Nachweis einer Tumorerkrankung zum Spendetermin bzw. davor, keine bekannten familiären Erkrankungen, keine erhöhte natürliche Exposition gegenüber Bestrahlung und anderen mutagenen/kanzerogenen Stoffen im beruflichen bzw. privaten Bereich).

Von 108 Blut-DNA-Proben normaler Probanden, die anteilig bereits von Taubert et al. (2000) mittels Sequenzierung und Restriktionsverdau unabhängig auf den mdm2-Polymorphismus untersucht worden waren, konnten alle damals detektierten heterozygoten DNA-Proben mittels PCR-ELISA eindeutig verifiziert werden. Weiterhin konnten die Polymorphismen-Befunde von 31 DNA-Proben von WTS-Geweben aus dieser Vorstudie mit einer 100%igen Spezifität bestätigt werden. Dariüber hinaus wurden von einigen dieser WTS-Patienten (n=6), deren Tumorgewebe-DNA den mdm2-Polymorphismus aufwies, korrespondierende DNA-Blutproben analysiert, die wiederum alle positiv in der Detektion waren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die an WTS-Patienten-Gewebe-DNA-Proben detektierten Polymorphismen mit hoher Wahrscheinlichkeit alle hereditärer Natur sind, d.h. der Polymorphismus ist in der Keimbahn konserviert.

Das Prostatakarzinom (PCa) ist die zweithäufigste Krebserkrankung des Mannes in Mitteleuropa und hat aufgrund seiner steigenden Inzidenz in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. In den USA stellt sie mittlerweile die am häufigsten diagnostizierte Tumorart dar und repräsentiert nach dem Lungenkarzinom die Tumorentität mit der höchsten Tumor-

bedingten Sterberate. Die Krankheit wird in 80% der Fälle bei Männern über 65 Jahren diagnostiziert. Während das lokal begrenzte PCa durch die Entfernung der Prostata heilbar ist, kann bei lokal fortgeschrittenen und metastasierenden Tumoren nicht mehr von einer kurativen Behandlung ausgegangen werden. Die 3-Jahres-Überlebensraten liegen beim metastasierten Tumor nur bei 40%. Die Metastasierung erfolgt beim PCa über die Blut- oder Lymphbahnen. Die primären Ansiedlungsorte der lymphogenen Metastasierung sind die pelvinen Lymphknoten. Hämatogene Mikrometastasen betreffen vornehmlich das Skelettsystem und hier vor allem Becken und Wirbelsäule, aber auch einzelne Organe, wie die Leber und die Lunge. Beim metastasierten PCa zielen operative und medikamentöse Therapien auf die Unterdrückung der Bildung bzw. der Wirkung des Hormons Testosteron, welches maßgeblich die Proliferation der Prostata- und PCa-Zellen fördert. Die korrekte Bestimmung des Tumorstadiums, d.h. ob es sich noch um ein lokal begrenztes oder bereits metastasiertes PCa handelt, ist daher ganz entscheidend für die nachfolgende Therapieform. Die derzeitigen Untersuchungsmethoden, die bei der Primärdiagnostik des PCa angewendet werden, sind die digitale rektale Untersuchung, die Bestimmung des Tumormarkers PSA (prostataspezifisches Antigen) im Serum und bei einer Entnahme von Biopsiematerial, deren histopathologische Begutachtung sowie im Einzelfall die diagnostisch pelvine Lymphadenektomie und ggf. MRT und CT sowie Knochenszintigrafie. Eine beginnende Metastasierung (disseminierte PCa-Zellen im Blut, geringer Befall von regionären Lymphknoten) kann bis zum heutigen Zeitpunkt diagnostisch im Blut nicht bzw. im Falle der Lymphknoten ausschließlich postoperativ durch eine histopathologische Untersuchung nachgewiesen werden. Die zum präoperativen Nachweis zur Verfügung stehenden bildtechnischen Verfahren (CT, MRT) haben eine geringe Sensitivität, die zwischen 22-26% liegt und erlauben nur die Darstellung von ausgedehnten Metastasen. Da die Metastasierung in einer deutlichen Abhängigkeit zum Tumorstadium, Tumorvolumen und Tumorgrad steht, sind dies neben der histologischen

Differenzierung (Gleason Score) die wichtigsten Faktoren, die derzeit für eine Prognose der Patienten herangezogen werden.

Die Bestimmung des Tumormarkers PSA (prostataspezifisches Antigen) ist neben der digitalen rektalen Untersuchung eine sehr selektive und sensitive Standardmethode zur Früherkennung eines PCa. Das prostataspezifische Antigen ist jedoch kein karzinomspezifischer, sondern ein gewebespezifischer Marker der Prostata. Erhöhte PSA-Serumwerte deuten auf das Vorhandensein eines PCa hin. Die Differenzierung zwischen BPH und Karzinom mit Hilfe des PSA-Wertes fällt besonders im Bereich zwischen 2-10 ng/ml schwer, da die BPH mit steigendem Alter häufiger auftritt und der PSA-Wert aufgrund des natürlichen Prostatawachstums mit zunehmendem Alter ansteigt. Die Expression von PSA wird durch die Hormone Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) reguliert. Bei einer hormonellen Behandlung von Patienten (Hemmung der Wirkung von Testosteron, Dihydrotestosteron), kommt es zu einem Abfall des PSA-Wertes im Serum.

Aufgrund der gesundheitspolitischen Bedeutung des PCa (insbesondere in den westlichen Industrieländern), dem Fehlen tumorspezifischer Marker sowie der bekannten tumorbiologischen und zellulären Heterogenität des Tumors gibt es eine intensive Suche auf dem Gebiet der klinischen Forschung zum PCa, die u.a. auf die Identifizierung weiterer genetischer und epigenetischer Kofaktoren für das sporadische und hereditäre PCa fokussiert ist. Insbesondere in den USA gibt es gut charakterisierte Familien mit einer erhöhten PCA-Inzidenz, die weitreichende humangenetische Studien zum (familiären) PCa erlauben.

Die vorliegende Erfindung offenbart einen universellen hereditären Tumormarker mit dem Polymorphismus A → G (GAA → GAG) an der Position 354 des Exons 12 des mdm2-Gens insbesondere für PCa. Es wurde gezeigt, dass der

Polymorphismus eine strenge Assoziation zum PCa zeigt. Mit der Detektion dieses Polymorphismus kann eine Erhöhung der Aussage hinsichtlich einer genetischen Prädisposition für Pca und möglicher assoziierter Krankheitsbilder erzielt werden.

Referenzen:

- Freedman DA, Wu L, Levine AJ (1999) Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci* 55: 96-107.
- Juven-Gershon T, Oren M (1999) Mdm2: the ups and downs. *Mol Med* 5: 71-83.
- Momand J, Wu HH, Dasgupta G (2000) MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 242: 15-29.
- Würl P, Meye A, Berger D, Bache M, Lautenschläger C, Schmidt H (1997) Prognostic relevance of C-terminal MDM2 detection is enhanced by positivity in soft tissue sarcomas. *Diagn Mol Pathol* 6: 249-54.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Tumorsuszeptibilität, dadurch gekennzeichnet, dass eine Nukleinsäure eines Probanden isoliert und die Sequenz des menschlichen mdm2-Gens anhand des Basenaustausches A → G (GAA → GAG) an der Position 354 des Exons 12 genotypisiert wird, wobei eine Bestimmung des Alleliestatus dieses polymorphen Genortes erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Nachweis des homozygoten oder heterozygoten Polymorphismus (Mutation) als hinreichendes Kriterium für die genetische Prädisposition für eine potentielle Tumorsuszeptibilität verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, der Nachweis des homozygoten oder heterozygoten Polymorphismus (Mutation) als hinreichendes Kriterium für die genetische Prädisposition für ein potentielles Tumorrisko für den Probanden und für seine Nachkommen verwendet wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Nachweis der homozygoten oder heterozygoten Mutation als hinreichendes Kriterium einer potentiellen Tumorsuszeptibilität für Prostatakarzinom, Mammakarzinom, Zervixkarzinom und/oder Ovarialkarzinom verwendet wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Genotypisierung durch Sequenzierung der DNA oder durch andere Methoden, die zur Detektion von Punktmutationen geeignet sind, erfolgt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Genotypisierung durch DNA-ELISA unter Verwendung multipler, hochspezifischer Amplifikationsprimer und markierter Hybridisationssonden erfolgt.
7. Therapeutika, die auf Gene gerichtet sind, die die Pathways bezüglich des mdm2-Gens beeinflussen und/oder den Polymorphismus A → G (GAA → GAG) an der Position 354 des Exons 12 des mdm2-Gen oder damit zusammenhängender Gene angreifen und via Regulation der Transkription und Translation sowie zur Beeinflussung von deren Effizienz, vorzugsweise durch Regulation der Expression, wirken.
8. Therapeutika, die auf das humane mdm2-Gen gerichtet sind und die die ausgetauschte Position A → G (GAA → GAG) an der Position 354 im Exon 12 des mdm2-Gens angreifen und via Regulation der Transkription und Translation sowie zur Beeinflussung von deren Effizienz, vorzugsweise durch Regulation der Expression, wirken.
9. In vitro- und in vivo-Testsysteme, die die Form des menschlichen mdm2-Gens exprimieren, welche die Mutation (den Polymorphismus) A → G (GAA → GAG) an der Position 354 des Exons 12 des mdm2-Gens aufweist, wobei die Testsysteme zur Untersuchung von Erkrankungen mit Beteiligung des mdm2-Gens dienen, sowie zur Entwicklung und Testung individuell spezifischer Therapeutika im allgemeinen.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer gesteigerten Tumorsuszeptibilität durch eine spezifische Detektion eines Polymorphismus an der Position 354 A → G im Exon 12 des humanen murine-double-minute-gene-2 (MDM2-Gen). Dieser Polymorphismus stellt einen hereditären Marker für ein erhöhtes Krebsrisiko beim Menschen dar. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung dieses Tumorsuszeptibilitätsmarkers zur Entwicklung von in vitro- und in-vivo Testsystemen, die in spezifischer Weise diesen Marker für diagnostische, prognostische und möglicherweise auch therapeutische Verfahren einbinden.